Rôle protecteur du *Suillus granulatus* contre le *Mycelium radicis atrovirens* sur des semis de *Pinus resinosa*[1,2]

CLAUDE RICHARD ET J.-ANDRÉ FORTIN

Station de Recherche, Agriculture Canada, 2560 chemin Gomin, Ste-Foy, Québec G1V 2J3, et Département d'Ecologie et de Pédologie, Université Laval, Ste-Foy, Québec G1K 7P4

Reçu le 24 janvier 1975

Approuvé le 10 juin 1975

RICHARD, C., et FORTIN, J.-A. 1975. Rôle protecteur du *Suillus granulatus* contre le *Mycelium radicis atrovirens* sur des semis de *Pinus resinosa*. Can. J. For. Res. **5**, 452–456.

L'effet néfaste du *Mycelium radicis atrovirens* envers des plants de *Pinus resinosa* (Pin rouge) a été renversé par le *Suillus granulatus* en culture gnotobiotique. La présence du CO_2 dans ces conditions semble aussi avoir stimulé la croissance des plants inoculés avec le *Suillus granulatus* seul comparativement aux témoins. A ce sujet, les auteurs invitent à la prudence quant aux conclusions à tirer d'expériences effectuées en récipients fermés.

Le *Suillus granulatus* exerce une action antagoniste envers plusieurs champignons pathogènes, vraisemblablement par la production d'une substance antibiotique.

RICHARD, C., and FORTIN, J.-A. 1975. Rôle protecteur du *Suillus granulatus* contre le *Mycelium radicis atrovirens* sur des semis de *Pinus resinosa*. Can. J. For. Res. **5**, 452–456.

Suillus granulatus prevented the stunting effect of root pathogen *Mycelium radicis atrovirens* on *Pinus resinosa* (red pine) seedlings grown in gnotobiotic conditions. In these conditions, the presence of carbon dioxide also seems to have stimulated a better growth of the seedlings inoculated with *Suillus granulatus* as compared with the controls. In the light of these findings, the authors suggest caution in the interpretation of results from experiments in closed containers.

Suillus granulatus has an antagonistic effect against many pathogenic fungi probably as a result of the production of an antibiotic.

Introduction

Suite à l'hypothèse de Zak (1964), selon laquelle les mycorrhizes jouent un rôle de protection contre les organismes pathogènes des racines, plusieurs travaux ont été conduits dans ce sens. Marx (1972) a revu la littérature des travaux antérieurs à ce sujet.

Pour notre part, nous avons démontré que le *Suillus granulatus* (L. ex Fr.) O. Kuntze empêche le *Phialocephala dimorphospora* Kendrick (connu sous le nom de *Mycelium radicis atrovirens* (Richard et Fortin 1973)) d'exercer ses effets néfastes sur la croissance de jeunes plants d'épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) BSP) cultivés in vitro (Richard *et al.* 1971). Plus récemment, nous avons étudié la pathogénèse du *M. radicis atrovirens* (Richard et Fortin 1974). Les buts du présent travail étaient de savoir si le même renversement se produisait avec le Pin rouge (*Pinus resinosa* Ait.) et de vérifier si la concentration du CO_2 dégagé par le mycelium pouvait interférer avec l'effet bénéfique du *S. granulatus*. En outre, nous cherchons à savoir si le *S. granulatus* exerce un effet antagoniste envers le *M. radicis atrovirens* et d'autres organismes pathogènes.

Matériel et méthodes

En vue de mesurer la concentration de CO_2 dans les fioles d'Erlenmeyer, des plants de *Pinus resinosa* Ait. furent élevés et inoculés selon la méthode utilisée précédemment (Richard *et al.* 1971). Trois séries de 25 fioles (50 ml) chacune ont été préparées et inoculées avec soit le *M. radicis atrovirens*, soit le *S. granulatus* ou les deux ensembles; une quatrième série de 25 fioles a été gardée comme témoin. Les graines germées ont été plantées dans un mélange de Vermiculite et de tourbe (proportion 220/30 en volume) auquel fut ajoutée la solution Melin-Norkrans (Norkrans 1949). Les fioles furent inoculées 2 semaines plus tard et incubées à 24°C et à une luminosité de 32 000 lm/m², 16 h par jour; la température durant la scotopériode était de 18°C. Le dosage du CO_2 fut effectué 8 semaines après le début de l'expérience à l'aide d'un analyseur de gaz à l'infrarouge (Beckmann, modèle IR 251A). Quelques heures avant le dosage, les bouteilles ont été placées dans une enceinte illuminée à environ 20 000 lm/m².

Le volume d'air de chaque bouteille à analyser étant très faible (environ 250 cm³), il a fallu pour conserver la plus grande précision possible, procéder en circuit fermé avec le minimum de volume pour

[1]Extrait d'une thèse de doctorat ès sciences, Université Laval, 1973.

[2]Octrois du CNRC no. A-3235 à J.-André Fortin.

le système analyseur (35 cm^3 pour la chambre à analyser, 10 cm^3 pour le tube à dessication et 27 cm^3 de boyaux).

Pour empêcher tout échange gazeux durant les manipulations des fioles, nous avons eu recours au système illustré à la figure 1. Sur le bouchon de caoutchouc-mousse utilisé pour fermer les fioles, nous avons apposé un bouchon de caoutchouc dur muni de deux aiguilles hypodermiques. L'une servant à l'entrée des gaz et l'autre à l'échantillonnage, ces deux aiguilles étaient enfoncées à deux niveaux différents dans la bouteille, en vue d'assurer un meilleur mélange des gaz apportés avec les gaz déjà présents.

Une courbe standard a été établie avec trois points correspondant à trois concentrations connues de CO_2 soit à 0 ppm (N à 100%), 248 ppm et 1000 ppm. La concentration (C) de CO_2 dans chaque fiole s'exprime par la formule suivante:

$$C = \frac{\text{volume total} \times c^1 - \text{volume de système} \times c^2}{\text{volume résiduel de la fiole}}$$

La concentration c^1 est obtenue en rapportant à la courbe de calibration la valeur donnée par l'analyseur. Entre chaque fiole, la concentration c^2 a été ramenée à 10 ppm à l'aide de l'azote pur. Les volumes totaux, du système et de la fiole étant respectivement de 322, 72 et 250 cm^3, la formule est devenue:

$$C = \frac{322\ cm^3 \times c^1 - 72\ cm^3 \times 10\ ppm}{250\ cm^3}$$

A la fin de l'expérience soit après 14 semaines, les racines des plants ont été examinées pour la formation d'ectomycorrhizes et les tiges ont été pesées après 24 h de dessication au four à 80°C.

Les méthodes utilisées pour les antibiogrammes ont été décrités précédemment (Richard 1971). Les essais ont été effectués en boîtes de Pétri, sur milieu gélosé de Melin et Das modifié (Fortin 1967), à l'obscurité dans un incubateur à 22°C. Le *S. granulatus* a été testé de cette façon envers le *M. radicis atrovirens*, le *Mucor racemosus* Fries, le *Pythium debaryanum* Hesse, *l'Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud, le *Fusarium oxysporum* Schl., le *Rhyzoctonia solani* Kühn., le *Polyporus tomentosus* var. *circinatus* (Fr.) Sartory et Maire, le *Polyporus tomentosus* Fr. et un *Cytospora* sp.

Les champignons ont été ensemencés de part et d'autre de la boîte de Pétri à 2 cm du bord. La zone d'inhibition est mesurée au moment où elle devient apparente.

L'effet d'inhibition contre les bactéries *Bacillus cereus* Frankland et Frankland, *Bacillus thuringiensis* Berliner et *Staphylococcus aureus* Posenback a été testées sur bouillon nutritif. Dans ce cas, le *S. granulatus* a été inoculé au centre de la boîte dans une cavité effectuée à l'aide d'un emporte-pièce.

Chaque combinaison a été répétée trois fois et des témoins, sans le *S. granulatus*, ont été prévus pour chaque organisme testé.

Résultats et discussion

Le poids des semis inoculés avec le *S. granulatus* fut plus élevé que celui des témoins et à peu près égal à ceux inoculés simultanément avec ce champignon et le *M. radicis atrovirens* (Tableau 1). Les plants inoculés avec le *S. granulatus* étaient mycorrhizés. Ces résultats confirment ceux obtenus auparavant avec le *P. mariana*, selon lesquels le *S. granulatus* prévient l'effet néfaste du *M. radicis atrovirens* (Richard *et al.* 1971).

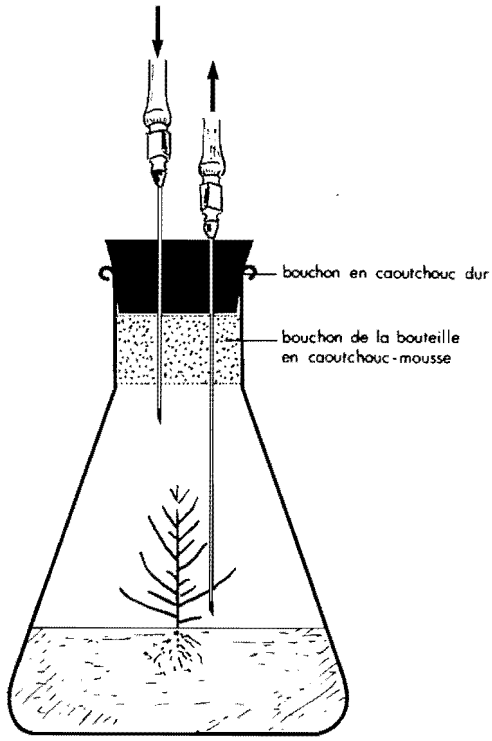


FIG. 1. Illustration d'une partie du dispositif permettant de mesurer la concentration en CO_2 dans les bouteilles sans contamination par le CO_2 de l'atmosphère.

Quant au CO_2, sa concentration était plus forte en présence du *M. radicis atrovirens* seul qu'en présence des deux champignons (Tableau 1). On sait que le taux de photosynthèse augmente avec la concentration en CO_2 (Meyer *et al.* 1960), ce qui constitue un facteur favorable à la croissance des semis inoculés avec le *M. radicis atrovirens* seul. Or, comme la meilleure croissance des semis a eu lieu en présence des deux champignons, on peut croire que dans ce cas cette différence n'est pas attribuable à la plus grande concentration de CO_2, mais bien à la présence du *S. granulatus*.

D'autre part, on remarque que la concentration en CO_2 dans les bouteilles témoins est très faible (197 ppm), comparativement à celle

TABLEAU 1. Poids des semis et concentration en CO_2 dans les bouteilles selon les organismes inoculés

	Nombre de bouteilles	Poids sec, mg*	Concentration en CO_2, ppm
Suillus granulatus	20	112.9a	500
Mycelium radicis atrovirens	24	60.2b	1465
Suillus granulatus + *Mycelium radicis atrovirens*	20	93.9a	1079
Témoins	19	71.5c	197

*Les moyennes diffèrent significativement au niveau de 1% lorsqu'elles sont suivies de lettres différentes.

dans les bouteilles avec le *S. granulatus* (500 ppm). Une partie de la différence de croissance entre les plants témoins et les plants inoculés avec le *S. granulatus* pourrait provenir de cette différence de concentration en CO_2. Cette constatation invite à la prudence lorsqu'il s'agit de tirer des conclusions à partir d'expériences effectuées en fioles avec des organismes autotrophes et hétérotrophes. Il faudrait alors répéter l'expérience à l'air libre dans des conditions d'aseptie partielle. L'aseptie complète, à l'air libre comme l'ont fait Marx et Bryan (1969) et Marx (1972), est encore préférable.

Aucune zone d'inhibition n'a été observée chez les bactéries étudiées alors que huit des neuf champignons testés ont été inhibés à distance par le *S. granulatus* (Tableau 2 et figures 2–5). Seul le *M. radicis atrovirens* ne l'a pas été. Le pouvoir inhibiteur du *S. granulatus* était connu envers le *Fomes annosus* (Fr.) Cooke (Hyppel 1968). De plus, Vaartaja et Salisbury (1965) ont trouvé que le *S. granulatus* exerçait un très fort antagonisme envers plusieurs champignons dont l'*A. pullulans* et le *P. debaryanum* avec lesquels nous avons aussi obtenu des résultats semblables.

TABLEAU 2. Antagonisme entre le champignon mycorrhizateur *Suillus granulatus* et différents champignons pathogènes

Champignons	Zone d'inhibition, mm*
Phythium deBaryanum	22
Fusarium oxysporum	10
Mucor racemosus	10
Aureobasidium pullulans	5
Rhizoctonia solani	13
Polyporus tomentosus var. *circinatus*	10
Polyporus tomentosus	8†
Cytospora	11
Mycelium radicis atrovirens	0

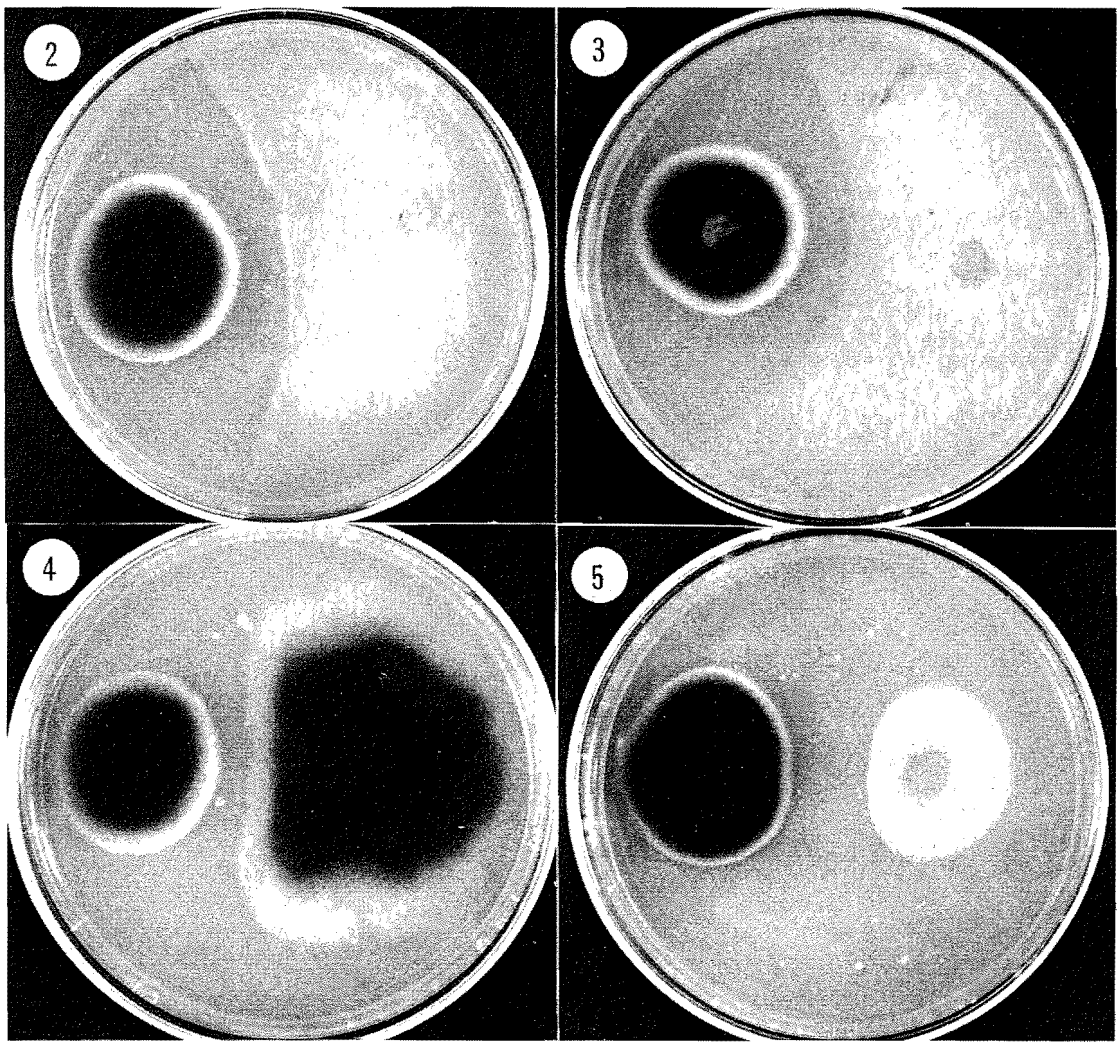
*Mesures prises lorsque la zone d'inhibition est observée pour la première fois.
†Moyenne de deux répétitions.

Le *S. granulatus* n'est pas reconnu comme un producteur d'antibiotiques mais sa capacité d'inhiber plusieurs champignons à distance suggère fortement l'action de substances antibiotiques. La confirmation de cette activité antifongique serait intéressante étant donné que l'activité antibiotique trouvée chez les champignons mycorrhizateurs est le plus souvent antibactérienne (Marx 1972). Ensemencés simultanément sur un milieu de gélose en culture pure, le *S. granulatus* et le *M. radicis atrovirens* n'ont pas donné de zone d'inhibition. Cependant, en fioles d'Erlenmeyer, le premier a envahi le substrat en profondeur, tandis que le dernier est resté en surface. Comme le *M. radicis atrovirens*, inoculé seul en fioles, pousse aussi en profondeur, on pourrait expliquer la réaction observée avec le *S. granulatus* par le phénomène dit "de barrière physique." D'autre part, l'activité antifongique du *S. granulatus* est vraisemblablement stimulé ou la substance produite devient plus efficace envers le *M. radicis atrovirens* lorsque son mycélium est en symbiose avec les racines.

Par ailleurs, Zak (1971) a démontré qu'un sol stérilisé à l'autoclave, toxique pour des plants de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, était désintoxiqué par un champignon mycorrhizateur, le *Corticium bicolor* Peck. Or le *M. radicis atrovirens* semble agir surtout en produisant une toxine (Richard et Fortin 1974). Comme nous n'avons pas trouvé d'antagonisme de la part du *S. granulatus* envers le *M. radicis atrovirens*, la désactivation de la toxine produite serait une hypothèse à vérifier.

Conclusion

Les résultats obtenus avec le *S. granulatus*



FIGS. 2–5. Test d'antagonisme entre le *Suillus granulatus* (à gauche) et d'autres champignons (à droite). Fig. 2, le *Fusarium oxysporum*; Fig. 3, le *Mucor racemosus*; Fig. 4, le *Polyrus tomentosus* var. *circinatus*; Fig. 5, un *Cytospora* sp.

et le *M. radicis atrovirens* sur le *P. resinosa* confirme ceux obtenus avec le *P. mariana* (Richard *et al.* 1971). Le CO_2 n'interfère pas avec l'effet préventif du *S. granulatus* mais les différences de concentration perçues dans les fioles témoins et dans les fioles inoculées invitent à la prudence lorsqu'il s'agit de tirer des conclusions.

Sur le milieu gélosé, le *S. granulatus* exerce un fort pouvoir inhibiteur envers plusieurs champignons pathogènes. Cependant, il s'est montré apparemment inefficace contre le *M. radicis atrovirens*.

L'inhibition à distance des autres champignons suggère la production d'un antibiotique par le *S. granulatus*.

FORTIN, J. A. 1967. Action inhibitrice de l'acide 3-indolylacétique sur la croissance de quelques basidiomycètes mycorrhizateurs. Physiol. Plant. **20**, 528–532.

HYPPEL, A. 1968. Antagonistic effects of some soil fungi on *Fomes annosus* in laboratory experiments. Stud. For. Succ. Skogshögsk., Stockh. **64**, 1–18.

MARX, D. H. 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. Ann. Rev. Phytopathol. **10**, 429–454.

MARX, D. H., et BRYAN, W. C. 1969. *Scleroderma bovista*,

an ectotrophic mycorrhizal fungus of pecan. Phytopathology, **59**, 1128–1132.

MEYER, B. S., ANDERSON, D. B. et BOHNING, R. H. 1960. Introduction to plant physiology. C. Van Nostrand Co., New York.

NORKRANS, B. 1949. Some mycorrhiza-forming *Tricholoma* species. Svensk. Bot. Tidskr. **43**, 485–490.

RICHARD, C. 1971. Sur l'activité antibiotique de l'*Armillaria mellea*. Can. J. Microbiol. **17**, 1395–1399.

RICHARD, C., et FORTIN, J. A. 1973. The identification of *Mycelium radicis atrovirens* (*Phialocephala dimorphospora*). Can. J. Bot. **51**, 2247–2248.

——— 1974. Distribution géographique, écologie, physiologie, pathogénécité et sporulation du *Mycelium radicis atrovirens*. Phytoprotection, **55**, 67–88.

RICHARD, C., FORTIN, J. A. et FORTIN, A. 1971. Protective effect of an ectomycorrhizal fungus against the root pathogen *Mycelium radicis atrovirens*. Can. J. For. Res. **1**, 246–251.

VAARTAJA, O., et SALISBURY, P. 1965. Mutual effects *in vitro* of microorganisms isolated from tree seedlings, nursery soil, and forests. For. Sci. **11**, 160–168.

ZAK, B. 1964. Role of mycorrhizae in root disease. Annu. Rev. Phytopathol. **54**, 377–392.

——— 1971. Detoxication of autoclaved soil by a mycorrhizal fungus. Pacific Northwest For. & Range Exp. Stn., U.S. Dep. Agric., For. Serv. Res. Note PNW-159.